

令和元年6月13日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05301

研究課題名(和文) Flt-1系を介する心腎連関分子機序の解明：新規LncRNAの関与

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Cardiorenal Syndrome through Flt-1 system: Involvement of novel LncRNA

研究代表者

齋藤 能彦 (Yoshihiko, Saito)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30250260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：心腎連関の分子機序は十分に理解されていない。本研究では、慢性腎臓病では胎盤由来増殖因子(PLGF)の産生が増加し、PLGFの内因拮抗物質であるPLGF特異的受容体(Flt-1)の可溶性アイソフォームであるsFlt-1の産生が低下することにより、PLGF/Flt-1系が活性化していることを証明した。その結果その下流に存在するMCP-1の活性化が心不全発症に関係していること、また、Flt-1下流でMEKに直接結合し、MEK活性を抑制する新規のLnc RNA Xを同定し、それが心肥大や心不全の発症に関係していることを発見した。これらの分子は心腎連関の分子機序に関与し、創薬の対象となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心腎連関は、よく知られた現象であるが、過去には、血行動態的に理解されていたが、その基盤に存在する分子機序は不明な点が多かった。しかし、今回、腎機能が低下すると、尿毒症毒素や参加ストレスを介して、血管内皮からのPLGFの産生が増加し、その内因性の拮抗物質である可溶性Flt-1の産生が低下した結果、心不全の発症につながることを実験的に証明した。また、Flt-1の下流に存在するMCP-1の関与と、新規に発見したnon-coding RNAがMEKを阻害する作用を介して介在していることを世界で初めて提唱した。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism of cardio-renal connection is unclear. In this study, we disclosed the upregulation of placental growth factor (PLGF) and down-regulation of its endogenous antagonist, soluble fms-like tyrosine kinase-1(sFlt-1). Consequently PLGF/Flt-1 signaling is activated in chronic kidney diseases. Mice specifically lacking sFlt-1 (sFlt-1 KO) with transverse aortic constriction (TAC), showed poorer prognosis than wild type mice with TAC. Ventricular hypertrophy and interstitial fibrosis were worsened in sFlt-1 KO, accompanied by MCP-1 upregulation. Using the microarray technique, we identified a novel long non-coding RNA X which specifically down-regulated in the ventricle of sFlt-1 KO with TAC. It directly binds to MEK and ERK phosphorylation. The treatment with AAV9 vector carrying shLnc RNA X inhibited Lnc RNA X in WT mice and worsened hypertrophy and cardiac function. MCP-1 and the Lnc RNA X would be possible drug discovery targets for cardiorenal connection.

研究分野：循環器内科学

キーワード：sFlt-1 CKD LncRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

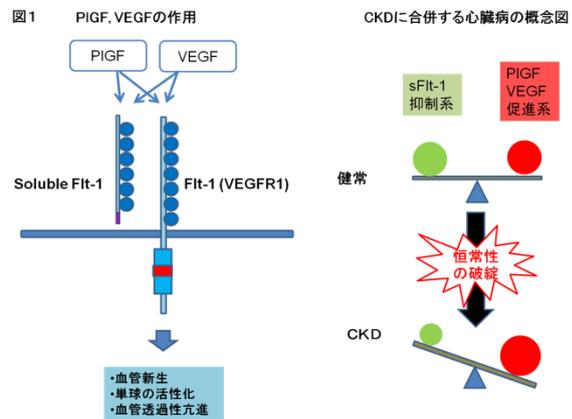
脳卒中を含む心血管病は国民の死因の約 1/3 をしめ、その数では悪性腫瘍とほぼ同じであるが、医療費は悪性腫瘍の 1.7 倍に達している。更に、今後高齢者の増加に伴い心血管病の罹患率、有病率は増加の一途をたどり、その医療費は膨張し、医療費全体のなかで更に大きな割合を占めることが想像される。高齢者における心血管病では心不全の発症の増加が特に重要である。心不全の 7 割の症例は、慢性腎臓病(CKD)を合併し、心腎連関と呼称されるようになった。CKD を合併する心不全は重症化しやすく、治療抵抗性であり、結果予後不良である。腎機能は加齢とともに低下し、CKD も高齢化とともに有病率が増加することを加味すると、心不全と CKD の合併する心腎連関の病態生理の解明とその有効な治療法の開発は、今後の循環器医療の大きな克服すべき課題である。

実際、CKD では動脈硬化が増悪し、動脈硬化性イベントが多い。CKD を対象にした臨床研究で、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害薬による降圧治療、スタチン治療により心血管イベントを有意に減少させることは可能であるが、残余リスクが多いことも事実である。したがって CKD から心血管イベント発症に至る機序には、RAS 阻害やスタチンの標的と異なる未知の分子機序の存在が推定されるが、これらは十分に理解されていない。

我々は、2009 年より、CKD から動脈硬化あるいは心臓病が高率に発症する心腎連関の分子機序に vascular endothelial growth factor (VEGF) のファミリーである placental growth factor (PLGF) とその受容体である Fms-like tyrosin kinase-1 (Flt-1) を介する情報伝達系が、重要な役割を果たしていることを、臨床的かつ実験的事実より証明してきた (Onoue K et al Circulation 2009, Matsui M et al Kidney Int 2013, Matsui M JASN 2015)。

PLGF は受容体である Flt-1 に結合し、血管新生作用を介して胎盤の血管新生・胎盤機能維持に重要な働きをしているが、成人の血管壁では、血管新生の他、単球活性化作用、炎症惹起作用を介して、動脈硬化促進的に働くことが知られている(図 1)。また、Flt-1 には主にイントロン 13 で選択的スプライシングにより細胞外ドメインより構成される可溶性 Flt-1 (sFlt-1) が存在し、sFlt-1 はデコイとして働き、PLGF の内因性拮抗物質である。PLGF、sFlt-1、Flt-1 は肺、腎臓等の血管内皮細胞や単球で産生されている。

我々が、CKD 症例の PLGF や sFlt-1 の産生を解析した結果、CKD 症例ではその重症度に比例して sFlt-1 の産生が腎臓、肺、血管で低下すること、逆に重症腎不全症例では PLGF の産生が増えることを臨床サンプルと動物腎不全モデルで確認した。さらに、重症 CKD 症例の血清を培養血管内皮細胞に添加すると sFlt-1 の産生減少し PLGF 産生が増加することを観察した。従って、CKD では重症度に従って PLGF のデコイである sFlt-1 が減少するために、相対的に Flt-1 系が活性化し、CKD で観察される動脈硬化の増悪に関与していること実験的に証明した(図 1)。さらに、我々は、ApoE 遺伝子欠損マウスに 5/6 腎摘にて慢性腎不全を作成すると、腎臓および肺での sFlt-1 産生が低下すると同時に動脈硬化が増悪することを確認し、リコンビナント sFlt-1 を 5/6 腎摘直後より 10 週間投与すると、動脈効果の増悪が抑制されることを明らかにしてきた。



### 2. 研究の目的

本研究では、上記の様に腎機能低下時における PLGF/Flt-1 系と sFlt-1 系のバランスの破綻が、心腎連関発症機序を解明することが目的である。具体的には、1) sFlt-1 特異的欠損マウス (sFlt-1 KO) を慢性腎臓病のモデルとして利用し、このマウスに圧負荷心不全モデルを作成し、その結果や sFlt-1 の下流で働く分子機序をさらに解明する。

また、2) ヒトにおいてこの sFlt-1 の系が心腎連関に関与しているかを臨床的に検討する。

### 3. 研究の方法

1) sFlt-1 KO の作成および圧負荷モデル実験

図2

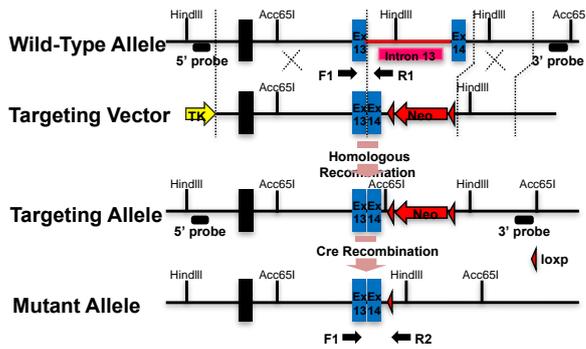


図2の様に、sF1t-1はF1t-1遺伝子のintron13でのalternating splicingにより生成されるために、この部位でのalternative splicingを避けるために、図2の様に、Ex13とEx14を直接連結させてtrans geneを作成し、それをknock-inしてsF1t-1 KOを作成した。このマウスは正常に出生し、見かけ上は正常に成長した。ただ、腹水中のマクロファージを採取すると、マクロファージ中のTNF- $\alpha$ やIL-6の遺伝子発現が亢進していた。このマウスに大動脈弓部で宿窄transvers aortic constriction (TAC)による圧

負荷を加え、心不全を作成した。

- 2) sF1t-1 KO 圧負荷モデルの下流で働く Long non-coding RNA の探索とその機能解析  
sF1t-1 KO に TAC 処理を施し、心不全の発症前に発現変化する分子をマイクロアレイで探索し、心不全や、心肥大発症におけるこの Long non-coding RNA の機能を解析し心腎連関の分子機序を解明する
- 3) PLGF/sF1t-1/F1t-1/MCP-1 系がヒトの心腎連関に関与していることの解析  
ヒト、尿毒症性心筋症の心筋生検サンプルを用いて、MCP-1 抗体で免疫染色を実施し解析する

#### 4. 研究成果

##### 1) sF1t-1KO TAC モデルの結果

本研究が開始される前に、sF1t-1 KO マウスはすでに作成に成功し TAC 負荷を施した予備実験は実施していた。

sF1t-1 KO に TAC を実施すると 1 週間以内で約半数のますが死亡し、この割合は野生型 (WT) より有意に高率であった。また、剖検の結果肺重量が増加していたことにより、心不全で死亡したと想像された。左室の組織解析では、sF1t-1KO では WT より有意にマクロファージの浸潤が多く、MCP-1 の発現が亢進し、さらに線維化が顕著であった。

この sF1t-1KO、TAC マウスで観察された結果が、sF1t-1 そのものの不足が関与していること、リガンドとして PLGF が働いていること、さらに、F1t-1 の下流で MCP-1 が関与していることを、確認するために、リコンビナント sF1t-1 タンパク質によるレスキュー実験、PLGF 中和抗体と MCP-1 中和抗体による中和実験を実施した。リコンビナント sF1t-1 により、TAC による心不全の増悪、マクロファージの浸潤の増強、線維化の増強もほぼ完全にブロックされた。

図3 PLGF中和抗体 ( $\alpha$ PLGF)

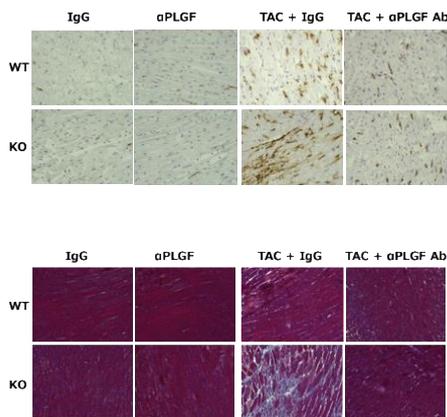
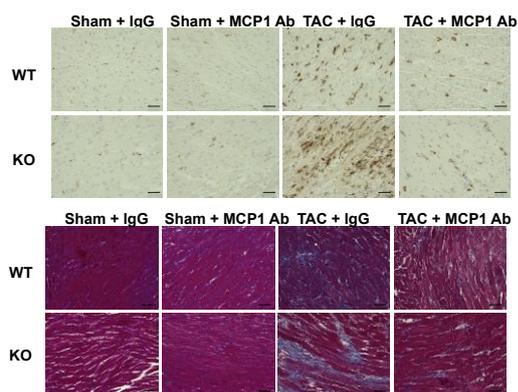


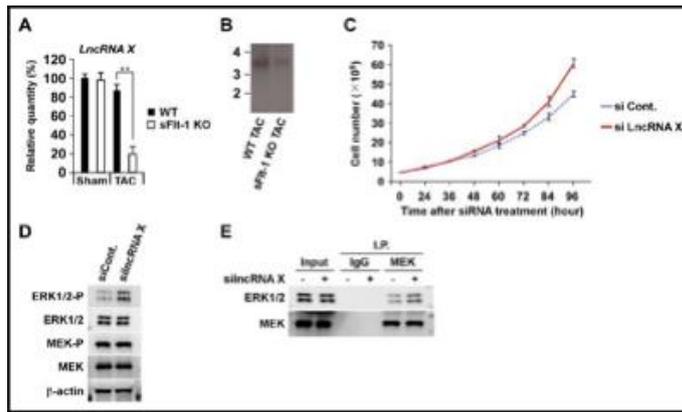
図4 MCP-1抗体を用いた中和実験



PLGF と MCP-1 に対する中和抗体による中和実験では図 3、4 の様に、ほぼ完全に、マクロファージの浸潤と線維化が抑制され、sF1t-1 の低下モデルにおける圧負荷に誘導される心不全、マクロファージの活性化と線維化には PLGF/F1t-1 系の活性化と、その下流で働く MCP-1 が関与していることが示唆された。

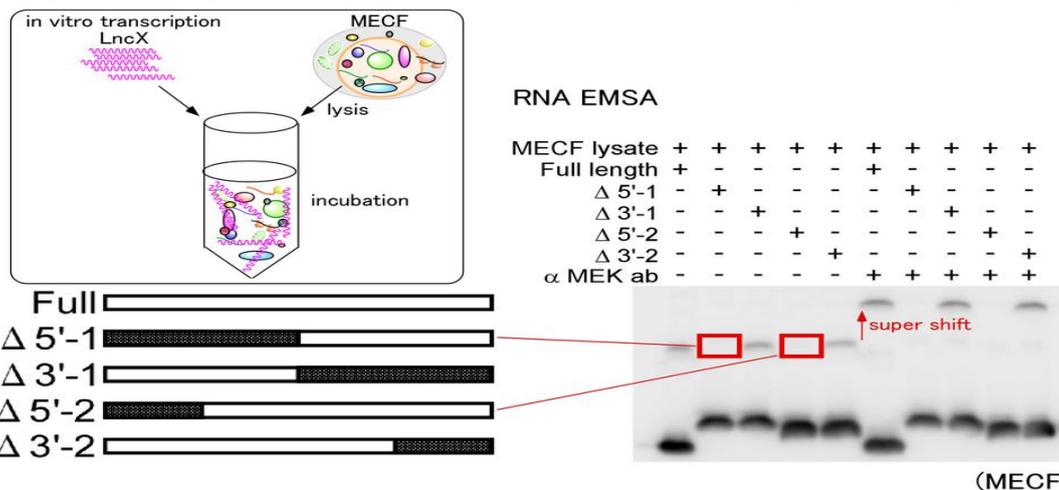
- 2) ssF1t-1 KO-TAC マウスで働く新規 long non-coding RNA X (Lnc RNA X) の発見とその機能解析

図5



ERK1/2 が共沈することが認められ、siLnc RNA X で LncRNA の発現を抑制して同様の実験をすると、共沈される ERK1/2 が増加することにより、LncRNA X が、MEK、ERK1/2 と複合体を形成していることが示唆された。そこで、今回は、LncRNA X の全長や 5' 側と 3' 側を欠損させたフラグメント LncRNAX を dig でラベルし、MECF のタンパク抽出物と一緒に電気泳動すると、全長 Lnc RNA X、また 3' 側欠損フラグメントのラベル体を用いた時には、シフトバンドが認められ、さらに、MEK の抗体と同時にインキュベーションすると、これらのシフトバンドがさらにスーパーシフトすることが観察され、LncRNAX と MEK が LncRNA X の 5' 側で結合することが示された。

図6 Lnc RNA Xを用いたRNA Electro-Mobility Shift Assay (RNA-EMSA)



次に、in vivo で Lnc RNA X の機能を検証するために、AAV9 ベクターに shLncRNA X を結合させたベクターを WT マウスを用いて検討した。

AAV9 shLnc RNA X を投与し、TAC 負荷を実施した。すると、AAV9 shLncRNA X を投与すると、Sham 手術、TAC 手術群とも LncRNAX は正常の約 3 割まで低下した。この低下は sFlt-1 KO に TAC 負荷を加えた時より少し低下の程度は弱いものの、ほぼ同程度に LncRNAX の発現は低下していた。また、AAVLncRNA X 群の心重量は WT より増加しており、EF は低下していた。さらに、in vivo でも AAV9 shLnc RNA X を投与した群でリン酸化 ERK が増強することが確認された。

この様に、LncRNAX は sFlt-1 KO で TAC を実施した時に特異的に低下する Lnc RNA で、MEK に直接結合し、ERK1/2 のリン酸化を抑制し、心肥大や心不全の発症に抑制的に働いていることが示唆された。

LncRNA X のヒトのカウンターパートは単純なホモロジー検索では、すぐには検索されない。しかし、LncRNA X はヒト線維芽細胞を用いても、siLNC RNA X が増殖作用を増強したことより、ヒト MEK にも結合することが示唆され、現在、ヒト MEK に結合してくる Lnc RNA を網羅的に探索している。

### 3) PLGF/sFlt-1/Flt-1/MCP-1 系がヒトの心腎連関に関与していることの解析

PLGF/sFlt-1/Flt-1/MCP-1 系がヒトの腎不全症例心不全の発症に関与している可能性を検討した。不整脈症例で、1 次性心筋疾患を除外するために実施された、左室生検組織、尿毒症症例で、左室機能低下が認められ、正常冠動脈であった症例の左室心筋生検組織、また、拡張型心筋症症例での左室生検組織を用いて、免疫組織学的に検討した。その結果、尿毒症性心筋症では、CD45 陽性細胞 (T 細胞) の数は DCM 組織と同等であったが、CD68 陽性細胞 (マクロファージ) は尿毒症で有意に浸潤が増強しており、それと並行して、MCP-1 陽性細胞が著しく DCM 組織より増強していた。これらのことから尿毒症では、sFlt-1 の産生が減少することで、相対的に

本研究新生児に、予備実験として、sFlt-1 KO 3 日目の組織を用いて、ssFlt-1 KO- TAC 特異的に発現低下する Lnc RNA X (図 5A) を同定しており、マウス胎児心臓由来線維芽細胞 (MECF) の増殖を siLnc RNA X が増強すること (図 5C)、そして、ERK1/2 のリン酸化を抑制している可能性を観察していた (図 5)。

Lnc RNAX は 3721nucleotides よりなっており、Northern blot では相当の位置に観察される (図 5B)。この LncRNA X と MEK 抗体を用いて免疫沈降させると、

PLGF/Flt-1/MCCP-1 系が活性化し、マクロファージの浸潤や線維化に少なくとも一部は繋がっている可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Nakano T, Onoue K, Nakada Y, Nakagawa H, Kumazawa T, Ueda T, Nishida T, Soeda T, Okayama S, Watanabe M, Kawata H, Kawakami R, Horii M, Okura H, Uemura S, Hatakeyama K, Sakaguchi Y, Saito Y.  
Alteration of  $\beta$ -Adrenoceptor Signaling in Left Ventricle of Acute Phase Takotsubo Syndrome: a Human Study.  
Sci Rep. 8:12731, 2018.
  - ② Seno A, Takeda Y, Matsui M, Okuda A, Nakano T, Yasuki N, Kumasawa T, Hitoshi N, Nishida T, Onoue K, Somekawa S, Watanabe M, Kawata H, Kawakami R, Okura H, Uemura S, Saito Y.  
Suppressed Production of Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 Contributes to Myocardial Remodeling and Heart Failure  
Hypertension. 68:678-87, 2016.
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- ① Nakagawa H, Kumazawa T, Yoshioka Y, Ioka T, Nakano T, Onoue K, Saito Y.  
Guanylyl Cyclase-A Signaling Attenuates the Deleterious Salt Effect on Mineralocorticoid Receptor  
The 2<sup>nd</sup> JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018 Sep 22-23 (Nara, Japan)
  - ② Nakano T, Onoue K, Hatakeyama K, Okura H, Sakaguchi Y, Saito Y.  
Involvement of Attenuation of  $\beta$ -Adrenoreceptors Signaling in Development of Takotsubo Syndrome.  
The 2<sup>nd</sup> JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018 Sep 22-23 (Nara, Japan)
  - ③ Kumazawa T, Nakagawa H, Nakada Y, Nakano T, Ishihara S, Onoue K, Saito Y.  
New Insight into the Molecular Drug Target of Cardio-renal Syndrome.  
The 2<sup>nd</sup> JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018 Sep 22-23 (Nara, Japan)
  - ④ Kumazawa T, Nakagawa H, Nakada Y, Nakano T, Ishihara S, Onoue K, Saito Y.  
A Novel Long Noncoding RNA Protects the Heart from Heart Failure Accompanied by Renal Dysfunction.  
The 2<sup>nd</sup> JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018 Sep 22-23 (Nara, Japan)
  - ⑤ Kumazawa T, Nishimura K, Nakagawa H, Nakada Y, Nakano T, Ishihara S, Onoue K, Saito Y.  
Nucleolus-mediated Cellular Senescence is involved in Heart Failure.  
The 2<sup>nd</sup> JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018 Sep 22-23 (Nara, Japan)
  - ⑥ 熊澤拓也、中川仁、中田康紀、中野知哉、尾上健児、斎藤能彦  
Reduction in Novel Long Noncoding RNA Exacerbate Cardio-Renal Syndrome  
第 82 回日本循環器学会学術集会 2018 年 3 月 23~25 日 (大阪)
  - ⑦ Nakada Y, Onoue K, Kumazawa T, Ishihara S, Kamon D, Nakano T, Nakagawa H, Okura H, Saito Y.  
Oral Carbon Absorbent Protects the Progression of Atherosclerosis via Preserving sFlt-1 Expression.  
The 1st JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018 Jan 6-7 (Tokyo, Japan)
  - ⑧ Kumazawa T, Nakagawa H, Nakada Y, Nakano T, Onoue K, Saito Y.  
A Novel Long Noncoding RNA LncX Suppresses the Progression of Cardiorenal Syndrome.  
The 1st JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018 Jan 6-7 (Tokyo, Japan)
  - ⑨ Nakada Y, Onoue K, Ishihara S, Kamon D, Nakano T, Nakagawa H, Kumazawa T, Okura H, Saito Y.  
The influence of oral carbon adsorbent, AST-120, on the production of Soluble Flt-1 and the progression of atherosclerosis.  
第 21 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2017 年 12 月 8 日~10 日 (大阪)
  - ⑩ Kumazawa T, Nishimura K, Saito Y.  
Nucleolus Mediated Cellular Senescence is Involved in Cardiac Hypertrophy

American Heart Association Scientific Sessions, 2017 Nov 11-15 (Anaheim, USA)

- ⑪ Nakada Y, Onoue K, Kumazawa T, Ishinara S, Nakano T, Nakagawa H, Matsui M, Okura H, Saito Y.

Oral Carbon Absorbent, AST-120, Protects the Progression of Atherosclerosis in a Chronic Renal Failure Model of Mice via Preserving sFlt-1 Expression Level

American Heart Association Scientific Sessions, 2017 Nov 11-15 (Anaheim, USA)

- ⑫ Kumazawa T, Saito Y.

Nucleolus-mediated cellular senescence signal contribute to Cardiomyocyte hypertrophy.

第 33 回国際心臓研究学会日本部会 2016 年 12 月 16~17 日 (東京)

- ⑬ 尾上健児、松井勝、妹尾絢子、竹田征治、岩間一、松本貴樹、上村史朗、斎藤能彦  
心血管疾患における PIGF/Flt-1 系の役割

第 20 回心血管内分泌代謝学会学術総会 2016 年 12 月 16 日~17 日 (東京)

- ⑭ Saito Y.

Natriuretic Peptide System: Its Role In Heart Failure And Acute Myocardial Infarction.

International Society for Heart Research XXII World Congress, 2016 Apr 18-21 (Buenos Aires, Argentina)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称: ー

発明者: ー

権利者: ー

種類: ー

番号: ー

出願年: ー

国内外の別: ー

○取得状況 (計 0 件)

名称: ー

発明者: ー

権利者: ー

種類: ー

番号: ー

取得年: ー

国内外の別: ー

[その他]

<http://www.naramed-u.ac.jp/~1int/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 熊澤 拓也

ローマ字氏名: Kumazawa Takuya

所属研究機関名: 奈良県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 10745441

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名: 尾上 健児

ローマ字氏名: Onoue Kenji

所属研究機関名: 奈良県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 90510173

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。